

Factors Affecting Zoospore Production by *Aphanomyces* sp. — Causal Fungus of *Aphanomyces* Basel Rot of Dutch Iris, and its Penetration of Dutch Iris Roots.

Keiichi HORIMOTO and Takashi KODAMA

緒 言

奈良県田原本町のダッチ・アイリス生産地域において、1977年以來ダッチ・アイリスが腐敗枯死する症状が発生し、甚大な被害をもたらしている。筆者らは本症状の原因究明を行った結果、*Aphanomyces* 属菌によって引き起こされる病害であることを明らかにし、病名を黄化腐敗病と呼称することを提案した⁵⁾。海外において *Aphanomyces* 属菌の研究は、非常に多くかつ多方面にわたっているが、わが国ではやっと緒についたばかりである。本報告では黄化腐敗病の発生生態および防除対策の資料とするため、本病原菌の遊走子生産と、その侵入過程について調査した試験結果を報告する。本報告の一部は1983年関西病害虫研究会³⁾において発表した。

1. 遊走子形成培地の検索

材料および方法

遊走子を形成させる方法として、本菌を栄養液体培地で前培養し、伸長した菌叢を滅菌水で後培養する方法を用いた⁴⁾。前培養の栄養液体培地として、ジャガイモ「メークイン」、大根「耐病総太り」、白カブ「小町」、赤カブ「スカーレットグローブ」、ダッチ・アイリス球根「アイデアル」の各々200g、100gに水を加え30分煮沸した後ろ過し、1ℓに調整した後滅菌した液を供試した。あらかじめダイコン煎汁寒天培地(ダイコン根部200gに水を加え30分煮沸した後ろ過し寒天15gを加え1ℓとしたもの、以下RA培地)で本菌を10日間培養した後、菌叢を直径1cmのコルクボーラーで打ち抜き、上記の栄養液体培地25ml(200ml容三角フラスコ)で24℃条件下48時間前培養した。その後伸長した菌叢を25mlの滅菌水(直径9cmベトリ皿)で24℃24時間後培養し、形成された遊走子数をトーマ氏の血球計で計測した。

結 果

供試した栄養液体培地の中ではアイリス球根100g培地(以下アイリス液体培地)で、特異的に遊走子形成が多く認められ、200gでは極めて少なくなった。他の培

地素材ではアイリス液体培地に比べ形成量は少ないが、その形成量はダイコン、赤カブ、白カブ、ジャガイモの順となった(第1表)。

第1表 培地素材の違いが遊走子形成に及ぼす影響

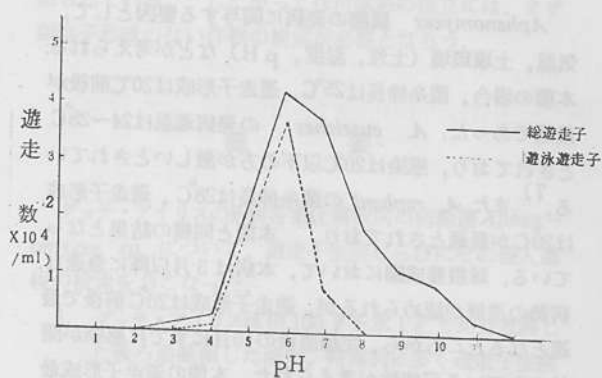
培地素材	使用濃度	遊走子数1)
	g/ℓ	×10 ⁴ /ml
ジャガイモ	200	0.05
	100	0.05
ダイコン	200	0.34
	100	0.6
白カブ	200	0.05
	100	0.05
赤カブ	200	0.1
	100	0.1
ダッチ・アイリス	200	0.07
	100	2.3

1) 30視野当りの平均遊走子数

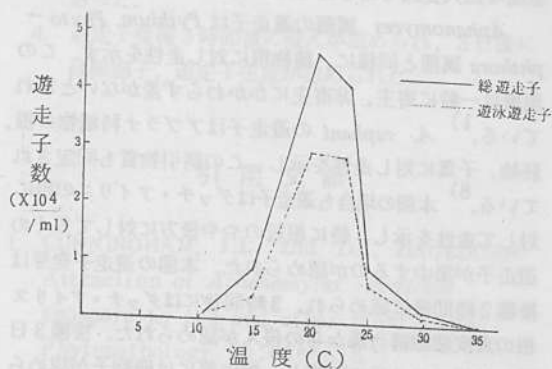
2. 遊走子形成におよぼす温度とpHの影響

材料および方法

RA培地で本菌を10日間培養した後、菌叢を直径1cmのコルクボーラーで打ち抜き、アイリス液体培地25mlで24℃、48時間前培養した。遊走子形成温度の検索として、伸長した菌叢を滅菌した0.05%のリン酸緩衝液(pH6.0)25mlに入れ、5℃から35℃まで8段階の温度条件下で24時間後培養し、形成された遊走子数をトーマ氏の血球計で測定した。遊走子形成pHは、伸長した菌叢を0.1NのNaOH、HClでpH3からpH12まで調整した0.05%リン酸緩衝液で、20℃、24時間後培養し、同様の方法で遊走子数を測定した。



第1図 遊走子形成に及ぼす pH の影響



第2図 遊走子形成に及ぼす温度の影響

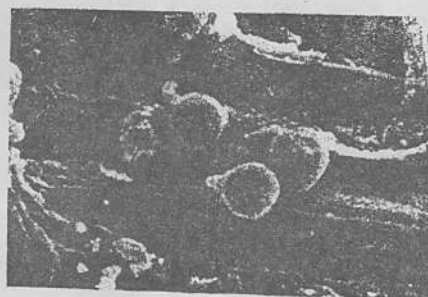
3. 遊走子のダッチ・アイリス根への侵入過程 材料および方法

あらかじめ RA 培地で培養した本菌を、ダッチ・アイリス液体培地で 24°C、48 時間前培養した後、伸長した菌叢を 0.05% リン酸緩衝液 (pH 6.0) に入れ、20°C、24 時間後培養して遊走子を形成させた。この遊走子液に砂ざし発根させたダッチ・アイリス (根長約 5 cm) を、球根ごと浸漬し 20°C 条件下においた。浸漬後経時的にとり出し、光学顕微鏡 (Nikon OPTIPHOT 生物顕微鏡)、電子顕微鏡 (明石走査電子顕微鏡 ALPHA-9) で遊走子のダッチ・アイリス根部への侵入過程を観察した。接種 2 時間以降は 20°C 条件下の湿室に移した。光学顕微鏡用試料は直接検鏡と、

固定液 (ホルマリン 1, 水酢酸 1, アルコール 8) で固定後、コットンブルーで染色して観察した。電子顕微鏡用試料は、タンニン酸を含むグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで 2 重固定し、水洗後エタノールで脱水し、酢酸イソアミルに置換した。さらに臨界点乾燥後金蒸着して観察に供した。

結 果

接種 15 分後に遊走子はすでに根面に附着しており、附着部位は根冠部やや後方に多く認められた。接種 2 時間後に遊走子発芽が認められ (第 3 図)、3 時間後には組織内への侵入が認められた (第 4 図)。侵入部位は表皮細胞の縫合部からであった。

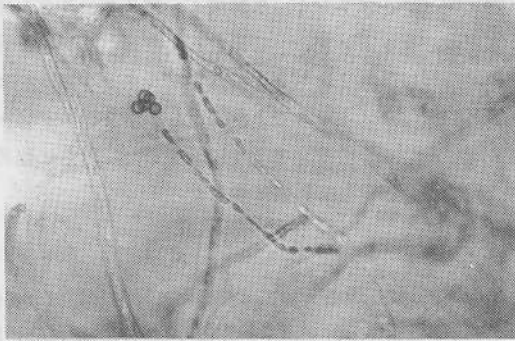


第3図 遊走子の発芽

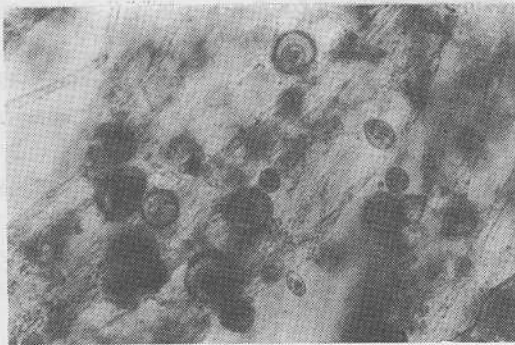


第4図 遊走子の侵入

接種 3 日後には根は菌糸でおおわれ、遊走子形成が開始された (第 5 図)。根内部組織には卵胞子が観察された。接種 4 日後には根は淡褐色に腐敗し、根内部には卵胞子が多数認められた。遊走子生産も盛んとなり、また球根の根盤上部に菌糸の侵入が認められた。接種 6 日後には根盤上部に卵胞子形成が認められた (第 6 図)



第5図 遊走子生産



第6図 卵胞子形成

論 議

わが国において *Aphanomyces* 属菌研究の歴史は浅く、緒についたばかりであるが、海外ではその生理・生態学的に、非常に多くの研究がなされている。遊走子生産に関与する物質として、*A. raphani* ではRadish-peptone培地⁴⁾が、また *A. euteiches* では Ca^{++} 、 Mg^{++} 、 K^{+6} が促進するとされている。前報に示したように、本菌は上記の *Aphanomyces* 属菌と同様に、ペプトン培地、RA培地、PDA培地で良好な生育を示す。しかしながら本菌は、これらの液体培地では遊走子形成は少なく、ダッチ・アイリス液体培地で特に多く認められた。したがって本菌の栄養要求性において、菌糸伸長は他の *Aphanomyces* 属菌と同様であるが、遊走子形成についてやや異なるものと思われる。また20種類の糖類、アミノ酸等について検索したところ、麦芽エキス(ニッスイ)2%に遊走子形成が認められた。

Aphanomyces 属菌の発病に関与する要因として、気温、土壤環境(土性、湿度、pH)などが考えられる。本菌の場合、菌糸伸長は25°C、遊走子形成は20°C前後が最適であった。*A. euteiches* の発病適温は24~28°Cとされており、感染は20°C以下の方が激しいとされている。⁷⁾ また *A. raphani* の菌糸伸長は28°C、遊走子形成は20°Cが最適とされており、⁴⁾ 本菌と同様の結果となっている。球根養成圃において、本病は3月以降に急速な病勢の進展が認められるが、遊走子形成は20°C前後で最適となるところから、定植直後の10月にすでに感染が開始されている可能性が考えられた。本菌の遊走子形成最適pHは6であったが、本県の水田土壤のpHは6前後が多い。また現地の圃場は水田転換畑であるため、土壤水分が高く遊走子の移動が容易であり、これらが本病の急速な拡大要因であると考えられる。

Aphanomyces 属菌の遊走子は *Pythium*、*Phytophthora* 属菌と同様に、植物根に対し走性を示す。この現象は一般に寄主、非寄主にかかわらず差がないとされている。¹⁾ *A. raphani* の遊走子はアブラナ科植物の根、胚軸、子葉に対し走性を示し、この誘引物質も同定されている。⁸⁾ 本菌の場合も遊走子はダッチ・アイリスの根に対して走性を示し、特に根冠のやや後方に対して多くの遊走子が集中するのが認められた。本菌の遊走子発芽は接種2時間後に認められ、3時間後にはダッチ・アイリス根の表皮細胞縫合部からの侵入が認められた。接種3日後には根はアメ色に褐変し、根内部には卵胞子が認められ、遊走子の再生産が観察された。*A. euteiches* の遊走子は接種2時間以内にエンドウ根の表皮細胞壁を貫通し、61時間後には中心柔組織に侵入し、卵胞子形成も始まるとされており、²⁾ 本菌も同様の結果となった。接種4日後には遊走子形成が盛んとなり、球根内部に菌糸の侵入が認められた。球根養成圃は20~30万球/10aの密植であるため、2次伝染もきわめて急速に起こるものと思われる。接種6日後には球根根盤の上部に卵胞子形成が認められ、球根養成圃での軽い発病の球根は保菌球として、次代の伝染源となる可能性が考えられた。

Aphanomyces 属菌の研究において大きな障害となっているのは、選択培地のない点である。本病の防除においても、まず第一に土壤中の菌量の評価が必要となる。したがって今後、土壤中の卵胞子や遊走子を計測する選択培地の作成が必要となる。また *Aphanomyces* 病回避策として一般には輪作が行われているが、作付体系は確立されていない。*A. euteiches* はマメ科の他、ホウレンソウ、トマト、キャベツ等に卵胞子を形成することが

知られている。⁷⁾したがって作付体系の確立には、まず卵孢子形成のない作物の検索が必要となろう。

摘 要

ダッチ・アイリスの新病害黄化腐敗病の病原菌 *Aphanomyces sp.* について、遊走子生産ならびにその侵入過程の検索をおこなった。

1. ダッチ・アイリス球根 100 g を水 1 ℓ で 30 分煮沸した後ろ過滅菌した液で、特異的に多く遊走子生産が認められた。
2. 遊走子生産温度範囲は 15~30°C で、最適温度は 20°C であった。
3. 遊走子生産 pH 範囲は 3~11 で、最適 pH は 6 であった。
4. 遊走子接種 3 時間後に侵入が認められ、3 日後には卵孢子、遊走子生産が認められた。

引用文献

1. CUNNINGHAM, J.L. and D.J. HAGEDORN 1962. Attraction of *Aphanomyces euteiches* zoospore to pea and other plant roots. *Phytopathology* 52:616-618.

2. CUNNINGHAM, J.L. and D.J. HAGEDORN 1962. Penetration and infection of pea roots by zoospores of *Aphanomyces euteiches*. *Ibid* 52:827-834.
3. 堀本圭一・小玉孝司 1983. アイリス黄化腐敗病菌の遊走子形成と侵入過程 (講要). *関西病虫研報* 25:56.
4. HUMAYDAN, H.S. and P.H. WILLIAMS 1978. Factors affecting in vitro growth and zoospores production by *Aphanomyces raphani*. *Phytopathology* 68:377-381.
5. 一谷多喜郎・小玉孝司・福井俊男・堀本圭一・池田彰弘 1983. *Aphanomyces sp.* によるアイリスの新病害—黄化腐敗病 (仮称). *日植病報* 49:100.
6. MITCHELL, J.E. and C.Y. YANG 1976. Factors affecting growth and development of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 66:917-922.
7. 横沢菱三・国永史郎 1977. *Aphanomyces euteiches*. および *A. cochlioides* 遊走子の土壌中における生存期間と感染力. *日植病報* 43:501-507.
8. 横沢菱三・国永史郎 1979. カンランから単離される *Aphanomyces raphani* 遊走子の誘引物質: インドール 3-アルデヒド. *Ibid* 45:339-343.

Summary

Aphanomyces basal rot, caused by *Aphanomyces sp.* is one of the most important disease with Dutch iris in Nara Prefecture. Herein we discuss the suitable conditions for inducing zoospores and their penetration of Dutch iris roots.

Iris broth culture was effective for zoospore production. The temperature range was from 15°C to 30°C, and the optimum 20°C. The pH range was from 3 to 11, and the optimum 6.

In most cases, zoospores were attracted most strongly to the region behind the rootcap. In less than 15 minutes after inoculation, most of the zoospores encysted on the surface of the root, and after 2 hours the zoospores germinated by forming one single germ tube. After 3 hours, many germ tubes penetrated forward among the epidermal cells. After 3 days, oospore formation was observed in the root tissue, and zoospore reproduction began.

正 誤 表

訂 正 箇 所	誤	正
表 紙 6 項 目 目	入室加温時間	入室加温時期
P 1 6 図 面		第 13 図
P 2 6 左上から10行目	散光線 F R A	散光性 F R A
P 3 1 右上から14行目	結露水流下種	結露水流下量
P 3 3 右下から2行目	第 2 表	第 3 表
P 5 2 左下から5行目	カンパニユウ	カンパニユラ
P 8 1 上 部 見 出 し		P 79 上部参照
P 8 3 上 部 見 出 し	塚本圭一	堀本圭一
P 8 3 第 1 図 経 線 部	遊 走 数	遊 走 子 数